

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Versuche zur Lokalisation der
Paraoxonase nach
elektrophoretischer Auftrennung
im Stärkegel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Peter Deinzer
aus Bad Berneck

1981

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Versuche zur Lokalisation der
Paraoxonase nach
elektrophoretischer Auftrennung
im Stärkegel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Peter Deinzer
aus Bad Berneck

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.1981

Meiner Mutter und dem
Andenken meines Vaters



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546215_0052

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Problemstellung</u>	9
3. <u>Eigene Versuche</u>	10
3.1 Versuche zur Darstellung des gelben p-Nitrophenols	10
3.1.1 Auftrennung von Serum durch die Stärkegel- elektrophorese	10
3.1.1.1 Material und Methode	10
3.1.1.1.1 Herstellung des Stärkegels	10
3.1.1.1.2 Elektrophoreseapparatur	11
3.1.1.1.3 Versuchsverlauf.....	13
3.1.2 Färben des Stärkegels	16
3.1.2.1 Proteinfärbung	16
3.1.2.2 Paraaxonasefärbung	17
3.1.2.3 Hemmversuch mit EDTA	20
3.1.3 Versuchsergebnisse	21
3.1.3.1 Ergebnisse bei der Proteinfärbung	21
3.1.3.2 Ergebnisse bei der Paraaxonasefärbung ..	22
3.1.3.3 Einfluß von Spannung und Stromstärke, Temperatur und Laufzeit	22
3.1.3.4 Einfluß der verschiedenen Puffer	23
3.1.3.5 Einfluß der E 600-Konzentration	24
3.1.3.6 Einfluß von Calcium	24
3.1.3.7 Einfluß der Serummenge	24
3.1.3.8 Hemmung durch EDTA	25
3.2 Versuche zum Umfärben des gelben p-Nitrophenols	25
3.2.1 Versuche mit Dansylchlorid	26
3.2.1.1 Material und Methode	26
3.2.1.2 Versuchsergebnisse	27

3.2.2 Versuche mit Fast Red TR	28
3.2.2.1 Material und Methode	28
3.2.2.2 Versuchsergebnisse	30
3.2.3 Versuche mit o-Kresol	30
3.2.3.1 Material und Methode	30
3.2.3.2 Versuchsergebnisse	31
3.3 Versuche zur Lokalisation der Paraoxonase im Serum von Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Esel und Huhn	32
3.3.1 Material und Methode	33
3.3.2 Färben des Stärkegels	34
3.3.3 Hemmversuch mit EDTA	34
3.3.4 Versuchsergebnisse	34
4. <u>Diskussion und Zusammenfassung</u>	38
5. <u>Literaturverzeichnis</u>	40

1. Einleitung

SMITHIES gelang es 1955 erstmals, 10 bis 12 verschiedene Serumproteine mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese aufzutrennen. Bei der Anfärbung der Proteine fand er im Bereich der α_2 und β -Globuline Banden, die nicht in jedem Serum vorhanden waren. Er konnte drei verschiedene Typen von Haptoglobinen analysieren, die von Geschlecht, Alter und Rh-System unabhängig waren.

Noch im gleichen Jahr fanden SMITHIES und WALKER, daß die beobachteten Haptoglobinmuster Produkte von Genen sind und kodominant vererbt werden. Es mußte daher drei Gruppen von Haptoglobinen geben. Dieser Erbgang wurde später durch GALATIUS-JENSEN (1956), FLEISCHER und LUNDEVALL (1958), BAITSCH, PROKOP und FALK (1960) sowie FALK und PROKOP (1961) bestätigt. Dabei wurde folgende Einteilung der drei Haptoglobingruppen gewählt.

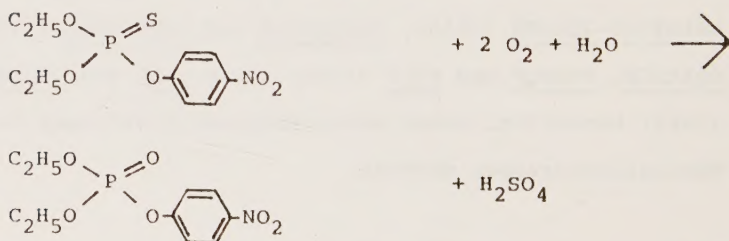
Tab. 1. Haptoglobingruppen

Phänotyp	Genotyp
Hp 1 - 1	Hp ¹ / Hp ¹
Hp 2 - 1	Hp ² / Hp ¹
Hp 2 - 2	Hp ² / Hp ²

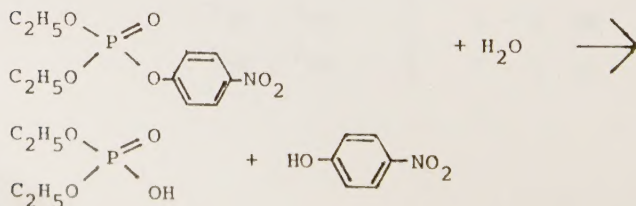
Die Möglichkeit, daß ein weiteres Protein im menschlichen Serum, die Paraoxonase, ebenfalls genetisch determiniert sein könnte, vertrat erstmals KRISCH 1968. Er beschrieb die Spaltung von E 600 in einer Konzentration von 10^{-4} M durch menschliches Serum. Gemessen wurde dabei die Extinktion der durch Hydrolyse freigesetzten Menge von p-Nitrophenol.

p-Nitrophenol entsteht nach NEAL (1967) im Stoffwechsel des Warmblüters folgendermaßen aus E 605:

E 605 wird durch Oxydation leicht unter Ersatz des Schwefels durch Sauerstoff in den analogen Phosphorsäureester E 600 überführt.



Durch enzymatische Hydrolyse wird dann das E 600 in Diäthylphosphorsäure und p-Nitrophenol gespalten.



KRISCH (1968) fand mit seinem photometrischen Test Paraoxon spaltende Aktivitäten von 38 bis 190 μM p-Nitrophenol pro Minute und Liter Serum in zwei sich überlagernden Gruppen. Veränderungen unter pathologischen Bedingungen ergaben sich nicht.

Auch ZECH und ZÜRCHER untersuchten 1974 die Aktivitätsverteilung der Paraoxonase an 619 Versuchspersonen im Alter von 4 bis 78 Jahren. Sie nahmen auf Grund ihrer Ergebnisse wie KRISCH eine bimodale Verteilung an.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. fanden 1969, daß E 600 in einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-7}$ M zur völligen Vergiftung der Acetylcholin spaltenden Enzyme des menschlichen Serums führt (Messung in der Warburg-Apparatur nach FRIEDBERG und SAKAI (1958)). Nach Senkung der Konzentration auf $3,2 \times 10^{-8}$ M konnten sie Restaktivitäten der Cholinesterase bestimmen, deren Werte, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, drei Gruppen zugeordnet werden konnten, nämlich solcher mit niedriger, mittlerer bzw. hoher Cholinesteraserestaktivität.

1972 fanden GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. nach Untersuchungen an 50 Versuchspersonen eine hochsignifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = + 0,82$) zwischen der Serumcholinesteraserestaktivität nach Vergiftung mit E 600 (Anti-ChE-Technik, GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. 1969)

und der Aktivität der E 600 spaltenden Paraoxonase, gemessen nach der Methode von KRISCH 1968. Unterschiedliche Serumparaoxonaseaktivitäten bedingen demnach unterschiedliche Cholinesteraserestaktivitäten und die verschiedenen Cholinesteraserestaktivitäten können somit als empfindliches Indikatorsystem für die Paraoxonaseaktivitäten benützt werden.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. untersuchten 1973 35 Familien mit zusammen 52 Kindern nach der Anti-ChE-Technik. Für die einzelnen Paraoxonasetypen wählten sie die in Tabelle 2 dargestellten neuen Bezeichnungen:

Tab. 2. Bezeichnungen für die Paraoxonasetypen

Serumcholinesteraserestaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serum - Paraoxonase-Aktivität	Paraoxonasetyp	
		früherer Name	neuer Name
niedrig	niedrig	Gruppe 1	1-1
mittel	mittel	Gruppe 2	2-1
hoch	hoch	Gruppe 3	2-2

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 3 zusammengestellt:

Tab. 3. Paraoxonasetypen bei 35 Familien mit 52 Kindern

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien n	Typ		
		1-1	2-1	2-2
		n	n	n
1-1 x 1-1	12	13	-	-
1-1 x 2-1	11	9	8	-
1-1 x 2-2	2	-	3	-
2-1 x 2-1	4	3	3	1
2-1 x 2-2	4	-	5	4
2-2 x 2-2	2	-	-	3
	35	25	19	8

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. deuteten ihre Ergebnisse mit einem 2-Allele-Modell und bestätigten erneut ihre Vermutung, daß der Polymorphismus der menschlichen Paraoxonase genetisch bedingt ist. Im Gegensatz zu KRISCH (1968) und ZECH und ZÜRCHER (1974) nehmen sie jedoch eine Mischverteilung aus den drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesteraserestaktivität an. Unterstützt wurde die Annahme des 2-Allelen-Modells weiterhin durch Untersuchungen zur Genetik der Paraoxonase an der Universität Erlangen von 1970 - 1973, bei denen die Paraoxonaseaktivität von 180 Personen nach der Methode von KRISCH (1968)

festgestellt wurden, was eindeutig auf eine Vererbung der Paraoxonasetypen nach einem 2-Allele-Modell hinwies. Die bisher umfangreichste statistische Auswertung zur Genetik der menschlichen Paraoxonase legten 1979 GELDMACHER-v.MAL-LINCKRODT, HOMMEL und DUMBACH vor. Sie verwerteten dabei die Daten von 601 nichtverwandten Personen und 99 Familien mit 180 Kindern, also insgesamt 799 Werte nichtverwandter Personen. Beim Vergleich der Verteilung der Cholinesteraseausgangsaktivität mit der Cholinesteraserestaktivität, gemessen in Prozent der Ausgangsaktivität, ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,033$. Die Unabhängigkeit ist damit statistisch belegt.

Da sich für die drei Gruppen verschiedener Cholinesteraserestaktivität keine Normalverteilung ergab, wurden die Werte nach KOLLER (1955) mit $\frac{(RA)}{1-RA}$ logistisch transformiert. Vom Histogramm dieser Werte konnte jetzt Normalverteilung bei den Gruppen verschiedener Cholinesteraserestaktivität angenommen werden. Auf Grund der Überlagerung der drei Gruppen ist aber eine genaue Trennung nicht möglich, so daß man einzelne Werte der Cholinesteraserestaktivität den Gruppen mit niedriger, mittlerer oder hoher Restaktivität nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zuordnen kann.

Nach einem Iterationsverfahren nach HOMMEL (1976) ergaben sich für die westdeutsche Bevölkerung die in Tabelle 4

wiedergegebenen Schätzwerte und 5 %-Konfidenzintervalle für die Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesteraserestaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M):

Tab. 4. Verteilung und 5 %-Konfidenzintervalle bei den 3 Paraoxonasegruppen

Paraoxonase- gruppe	prozentuale Verteilung	5 %-Konfidenz- intervalle
1 - 1	57,9	54,43 ; 61,39
2 - 1	36,1	32,77 ; 39,54
2 - 2	6,0	4,42 ; 7,84

Die Verteilung dieser drei Gruppen stimmte sehr gut mit der Hardy-Weinberg-Regel überein, was wiederum für die Vererbung der drei Paraoxonasegruppen nach dem 2-Allele-Modell spricht.

Ein Zusammenhang zwischen der Cholinesteraserestaktivität und den zwei Blutgruppensystemen ABO und Rh ließ sich nicht finden, ebenso wurde ein Einfluß des Alters auf die Cholinesteraserestaktivität ausgeschlossen. Bei der Prüfung der Geschlechtsabhängigkeit zur Cholinesteraserestaktivität wurden die gleichen Ergebnisse wie die von

KRISCH 1968 gefundenen ermittelt, nämlich im Mittel etwas höhere Werte von Cholinesteraserestaktivität bei Frauen als bei Männern. Eine geschlechtsgebundene Vererbung ist dennoch sehr unwahrscheinlich.

2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die drei verschiedenen Typen der Paraoxonase elektrophoretisch aufzutrennen und durch verschiedene chemische Reaktionen so anzufärben, daß deutlich sichtbare und genau zu lokalisierende Orte der Paraoxonaseaktivität bestimmt werden können.

Weiter sollte auch der Ort der Paraoxonaseaktivität auf dem Elektropherogramm bei verschiedenen Tierarten bestimmt werden.

3. Eigene Versuche

3.1 Versuche zur Darstellung des gelben p-Nitrophenols

3.1.1 Auftrennung von Serum durch die Stärkegelelektrophorese

3.1.1.1 Material und Methode

Verwendet für die Versuche wurden die Seren von Blutproben, die für wissenschaftliche Zwecke von freiwilligen und gesunden Spendern zur Verfügung gestellt wurden. Die Seren waren höchstens drei Tage alt.

3.1.1.1.1 Herstellung des Stärkegels

Die Stärke hat die Funktion eines "Ultrafilters", der die Proteine nach ihrer Form und Größe trennt. Deshalb ist ihr Molekulargewicht von großer Bedeutung.

Zur Herstellung des Stärkegels nach der Methode von SMITHIES (1955) wurde die gebrauchsfertig hydrolysierte 12 %ige Biotest-Stärke der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. 36 g dieser Stärke wurden in 150 ml aqua bidest. und 150 ml Boratpuffer folgender Zusammensetzung aufgeschwemmt.

Boratpuffer:

1,389 g Borsäure krist. (p.a.) +
0,999 g NaOH Plätzchen (reinst)
ad 1500 ml aqua bidest.

Die Stärkesuspension wurde unter dauerndem Schütteln über offener Flamme erhitzt, bis sie hochviskös wurde. Bei weiterem Erhitzen wurde sie wieder klar und dünnflüssig. Anschließend wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe völlig entgast. Die heiße Lösung wurde dann in einen ca. 1 cm hohen Trog aus PVC gegossen und mit einer Plastikplatte bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Die Gelbildung beginnt durch dreidimensionale Vernetzung bei ca. 60 Grad Celsius. Das Stärkegel ist nach zwei Stunden im Kühlschrank gebrauchsfertig.

3.1.1.1.2 Elektrophoreseapparat

Als Energiequelle wurde das Stromversorgungsgerät LKB 2103 der Firma LKB Instrument GmbH Grärfelfing benutzt. Bei diesem Gerät kann man sowohl Ausgangsleistung wie auch Strom und Spannung variieren. Durch Anlegen einer konstanten Ausgangsleistung werden optimale Strom- und Spannungsverhältnisse für die Elektrophorese geschaffen und so das Gel vor Überhitzung geschützt.

Das eigentliche Elektrophoresegerät LKB Multiphor der Firma LKB Instrument GmbH Grärfelfing hat gegenüber älteren Modellen den entscheidenden Vorteil der Kühlung. Eine hohle Glasplatte, deren Oberfläche nur 3 mm dick ist, wird von Wasser durchströmt und hält je nach Wassertemperatur, die an der Kühlmaschine eingestellt werden kann, das Gel konstant kühl.

Man kann deshalb im Gegensatz zu früheren Elektrophoreseapparaten mit wesentlich höheren Strom- und Spannungswerten arbeiten, was wiederum die Laufzeit der Elektrophorese erheblich verkürzt. Ein Plastikdeckel, der über das Gel gestülpt wird, verhindert zusätzlich ein Austrocknen des Gels.

Die Stromverbindung des Gels mit dem Stromversorgungsgerät geschieht folgendermaßen: An den beiden Längsenden des Elektrophoreseapparates befinden sich je zwei getrennte Wannen, die mit Puffer bis knapp unterhalb des oberen Randes gefüllt werden. Dieser Brückenpuffer mit $\text{pH} = 8,6$ wird hergestellt aus:

18,55 g Borsäure krist. (p.a.) +
2,63 g NaOH Plätzchen (reinst)
ad 2000 ml aqua bidest.

Das Kabel vom Stromversorgungsgerät läuft aus Sicherheitsgründen im Deckel der Elektrophoreseapparatur und wird erst durch Schließen des Deckels mit zwei Platinelektroden, die in die jeweils näher zur Mitte liegende der zwei Pufferwannen eintauchen, verbunden. Die Stromverbindung der zwei unmittelbar nebeneinander liegenden Pufferwannen wird durch fünf Lagen Filterpapier als Strombrücke hergestellt.

Von der jeweils äußersten der zwei Pufferwannen wird jetzt der Stromkreis zum Gel mit wiederum fünf Lagen Filterpapier

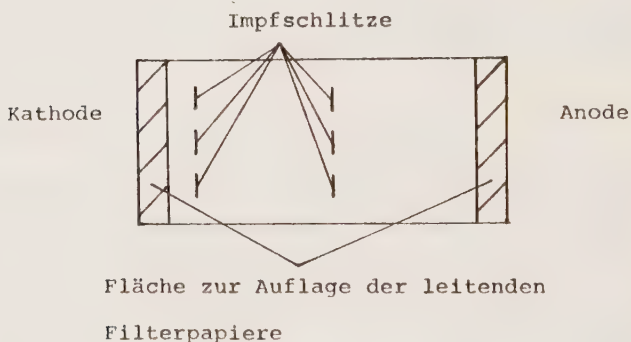
geschlossen. Der Brückenpuffer kann zweimal verwendet werden, wenn man beim zweiten Elektrophoreselauf die Stromanschlüsse umpolt.

3.1.1.1.3 Versuchsverlauf

Die vier Pufferwannen wurden mit dem Brückenpuffer gefüllt und jeweils zwei Wannen mit fünf Lagen Papier leitend verbunden. Die Kühlplatte wurde aufgelegt und durch Einschalten des Kühlaggregates auf + 5 Grad Celsius eingestellt. Um einen optimalen Kühleffekt durch bestmöglichen Kontakt zwischen Kühlplatte und Gel zu erreichen, wurden ca. 10 ml einer 1 %igen Seifenlösung gleichmäßig auf der Oberfläche der Kühlplatte verteilt. Das auf einer dünnen Kunststoffolie liegende Gel konnte so fest und ohne Luftblasen zwischen Kühlplatte und Kunststoffolie aufgelegt werden. Die jeweils fünf für die Stromleitung vom Puffer zum Gel notwendigen Filterpapiere wurden im Puffer eingeweicht.

Das gebrauchsfertige Gel wurde mit einem Skalpell auf die Maße der Kühlplatte zugeschnitten und auf eine dünne ebenso große Kunststoffolie gelegt. Da der Puffer einen pH-Wert von 8,6 hatte und deshalb viele Proteine als Anionen vorlagen, wurden mit einem Metallspatel sechs Schlitze von ca. 6 mm Breite für das Beimpfen des Gels so vorgestochen, daß die Laufrichtung der Proteine von der Kathode zur Anode war.

Abb. 1. Schematische Darstellung des Gels für die Elektrophorese



Der Abstand untereinander und vom Rand sollte ein Verzerren der Banden verhindern.

Aus Filterpapier wurden Rechtecke von 5 x 10 mm Größe geschnitten und mit einer Pinzette in Serum getaucht, wo sie etwa 10 bis 15 μ l Serum aufsaugten. Anschließend wurden diese Filterpapierrechtecke in die vorgestochenen Schlitze gesteckt.

Das Gel wurde jetzt auf die Kühlplatte gelegt, und zwar so, daß bei gegebener Polung eine Wanderung der Proteine zur Anode möglich war.

Die jeweils fünf mit Puffer getränkten Filterpapiere wurden nun in ganzer Breite und etwa 3 cm lang auf das Gel aufgelegt und mit einem Skalpell glattgestrichen, um einen optimalen Stromkontakt zu sichern. Das andere Ende hing dabei jeweils im Brückenpuffer.

Die Plastikhaube wurde aufgesetzt und der Stromkreis durch Schließen des Deckels hergestellt. Bei je nach Versuch verschiedenen Strom- und Spannungswerten wurde die Elektrophoreseapparatur eingeschaltet. Nach 5 Minuten Laufzeit wurde kurzfristig abgeschaltet und die getränkten Filterpapiere aus dem Gel gezogen, um Schleppen hinter den Banden zu vermeiden.

Bei den einzelnen Versuchen wurden verschiedene Parameter variiert.

So wurde die Spannung von 400 Volt über 600 Volt bis auf 800 Volt erhöht. Der Stromdurchfluß stieg dadurch von 20 mA über 40 mA bis auf 80 mA. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug versuchsweise zwei, drei, sechs, neun, elf und vierundzwanzig Stunden. Auch die Serummenge wurde verändert, indem das Gel mit einem, zwei oder vier getränkten Filterpapieren je Schlitz beimpft wurde.

3.1.2 Färben des Stärkegels

Nachdem die elektrophoretische Auftrennung beendet war, wurde das Gel aus der Apparatur genommen und mit einem dünnen Draht horizontal in zwei Hälften geschnitten. Mit einem Skalpell wurden die einzelnen Laufstrecken voneinander getrennt, so daß insgesamt zwölf einzelne Teile zum Färben verwendet werden konnten.

Um den Ort der Paraoxonaseaktivität feststellen zu können, wurde eine E 600 Lösung gewählt, für den Vergleich mit dem normalen Proteinmuster wurde mit Amidoschwarz gefärbt.

3.1.2.1 Proteinfärbung

Die zur Darstellung des normalen Proteinmusters geeignete Färbung mit Amidoschwarz besteht aus zwei Schritten.

Zunächst wird das Gel in eine Färbelösung gelegt, die aus

1 g Amidoschwarz 10 B	+
100 ml Eisessig	+
700 ml Methanol	+
200 ml aqua dest.	

besteht. Die Färbezeit beträgt etwa 20 Minuten. Dann wird mit einer Lösung aus

100 ml Eisessig	+
700 ml Methanol	+
200 ml aqua dest.	

entfärbt, bis das Gel wieder hell und durchsichtig wird, wobei die gefärbten Proteinbanden deutlich hervortreten. Der Färbe- wie auch der Entfärbevorgang kann beschleunigt werden, indem man die Lösungen jeweils mit einem elektrischen Rührer bewegt. Da die Gelstücke an der Luft sehr schnell eintrocknen und sich zusammenziehen, wurden sie sofort nach dem Entfärben ausgemessen bzw. fotografiert oder kurzfristig konserviert in einer Lösung aus

100 ml Glyzerin +
300 ml Äthanol +
400 ml aqua dest.

3.1.2.2 Paraoxonasefärbung

Die Sichtbarmachung des Ortes der Paraoxonaseaktivität beruht auf der in der Einleitung beschriebenen Hydrolyse. Die Gelstücke mit den aufgetrennten Proteinen wurden deshalb in E 600 Lösungen gelegt, die so verändert wurden, daß möglichst eindeutig eine durch p-Nitrophenol gelb gefärbte Stelle im Gel bestimmt werden konnte. Da die enzymatische Hydrolyse des E 600 ein pH - Optimum bei 11,2 hat, (KRISCH 1968), wurde anfangs auch mit Lösungen von pH = 11,2 gearbeitet.

Verwendet wurden ein Glycinpuffer pH = 11,2 und ein Tris-HCl-Puffer pH = 8. Der Glycinpuffer pH = 11,2 hatte folgende Zusammensetzung:

Lösung A:

7,507 g Glycin (p.a.) +

5,844 g NaCl (p.a.)

ad 1000 ml aqua bidest.

Lösung B:

0,1 n NaOH (Titrisol Merck)

Für den gebrauchsfertigen Glycinpuffer war die Mischung

49,95 ml Lösung A + 50,05 ml Lösung B

Der 0,2 m Tris-HCl-Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

Lösung A:

24,23 g Trishydroxy-methyl-amino-methan (p.a.)

ad 1000 ml aqua bidest.

Lösung B:

0,1 n HCl (Titrisol Merck)

Der gebrauchsfertige Puffer bestand aus:

25 ml Lösung A + 28,25 ml Lösung B ad 100 ml

aqua bidest.

Eine erste E 600 Stammlösung bestand aus:

300 µl E 600 +

0,2 ml (= 220 mg) Triton X-155

ad 100 ml Tris-HCl-Puffer 0,2 m

Zur Auslösung der Hydrolyse beim pH-Optimum von pH = 11,2 wurde die E 600 Stammlösung mit dem Glycinpuffer verdünnt.

Als Gefäße wurden Glasschalen von ungefähr 12 cm Durchmesser mit einem Fassungsvermögen von ca. 200 ml Färbelösung benützt. Um auch ganz leichte Gelbfärbungen im Gel erkennen zu können, standen sie auf weißem Papier.

Da KRISCH (1968) eine Calciumabhängigkeit der Hydrolyse beschrieb, wurde versuchsweise Calcium zugesetzt, sodaß die Konzentration 0,1- molar war. Das entsprach bei 80 ml Glycinpuffer in insgesamt 100 ml Färbelösung einer Menge von 1,837 g Calcium.

Die einzelnen Färbeversuche wurden mehrmals wiederholt und die Färbelösungen wie folgt variiert:

Zum Gel in der Glasschale wurde zugewogen:

- 1) 2,5 ml E 600 Stammlösung + 80 ml Glycinpuffer +
0,1 m Calcium
- 2) 2,5 ml E 600 Stammlösung + 80 ml Glycinpuffer
- 3) 20 ml E 600 Stammlösung + 80 ml Glycinpuffer +
0,1 m Calcium
- 4) 20 ml E 600 Stammlösung + 80 ml Glycinpuffer
- 5) 20 ml E 600 Stammlösung + 80 ml H₂O + 0,1 m Calcium
- 6) 20 ml E 600 Stammlösung + 80 ml H₂O
- 7) 2,5 ml E 600 Stammlösung + 80 ml H₂O + 0,1 m Calcium
- 8) 2,5 ml E 600 Stammlösung + 80 ml H₂O

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die E 600 Stammlösung und der Puffer geändert. Um die nichtenzymatische Hydrolyse des E 600 zu vermeiden, lag der pH-Wert des Puffers nun bei $\text{pH} = 9$. Verwendet wurde ein Tris-HCl-CaCl₂-NaCl-Puffer mit folgender Zusammensetzung:

6,0575 g Tris wurden in 250 ml aqua bidest. gelöst. Zu 250 ml der Lösung wurden 53 ml 0,1 n HCl zugegeben. Damit betrug der pH-Wert des Tris-HCl-Puffers $\text{pH} = 9$. 73,5 mg CaCl₂ $\times$ 2H₂O (p.a.) plus 1,752 g Na Cl (p.a.) plus 0,7 mg EDTA (Titriplex II) wurden im obigen Tris-HCl-Puffer gelöst und auf 250 ml damit aufgefüllt. Der Tris-HCl-CaCl₂-NaCl-Puffer $\text{pH} = 9$ war gebrauchsfertig.

Die E 600 Menge wurde ebenfalls verringert. Zu 250 ml des Tris-HCl-CaCl₂-NaCl-Puffers wurden nur noch 50 μl E 600 und 2,5 μl Triton X-155 gegeben. Das ganze wurde gut geschüttelt bzw. im Ultraschallbad gemischt. Die Färbelösung war gebrauchsfähig und etwa 3 bis 4 Tage haltbar, danach trat eine Gelbfärbung der Lösung ein, die eine klare Identifikation der gelben p-Nitrophenolflecken erschwerte.

3.1.2.3 Hemmversuch mit EDTA

Um die Hemmbarkeit der Hydrolyse bei Anwesenheit von EDTA (Äthylen-diamin-tetra-acetat) zu überprüfen, wurde zur Färbelösung EDTA zugesetzt in einer Menge von 10^{-2} Mol/l.

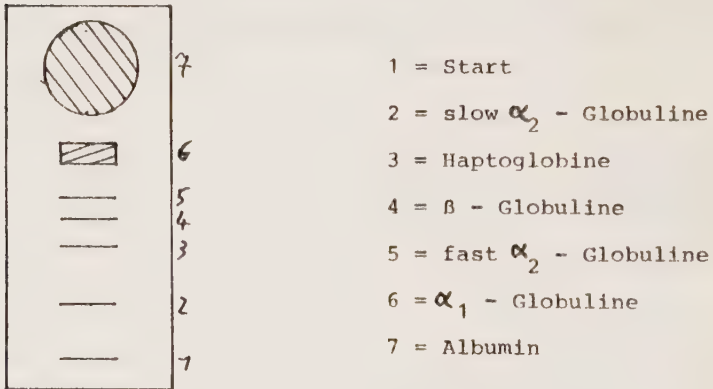
3.1.3 Versuchsergebnisse

Bei der oben beschriebenen Beimpfung des Gels wurden die näher an der Kathode liegenden Serumproteine gleichmäßig aufgetrennt, während die Proteine, die bei der Beimpfung näher an der Anode lagen, sich langsamer auftrennten. Da es bei diesen Versuchen jedoch nur um den Vergleich des Ortes der Paraoxonaseaktivität zu den Serumproteinen ging, konnten beide Auftrennungen verwendet werden.

3.1.3.1 Ergebnisse bei der Proteinfärbung

Grundsätzlich konnte das Serum bei den verschiedenen Versuchsbedingungen meistens in 5 Serumproteinbanden und einen Albuminfleck aufgetrennt werden. Bei 800 Volt, 80 Milliampère und einer Laufzeit von zwei Stunden ergab sich zum Beispiel folgendes Bild (Abb. 2):

Abb. 2. Elektrophoretisch aufgetrenntes menschliches Serum nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz (800 V, 80 mA)



3.1.3.2 Ergebnisse bei der Paraoxonasefärbung

Nach ungefähr 15 Minuten konnte bei allen Versuchsbedingungen ein gelber p-Nitrophenolfleck von ca. 5 bis 8 mm Durchmesser nachgewiesen werden, der sich eindeutig zwischen dem Albuminfleck und der α_1 -Globulin-Bande befand. Durch die schnelle Diffusion des entstehenden p-Nitrophenols ins Gel war eine millimetergenaue Lokalisation der Paraoxonaseaktivität jedoch nicht möglich.

3.1.3.3 Einfluß von Spannung und Stromstärke, Temperatur und Laufzeit

Ohne Kühlung erwärmte sich das Gel bei der Elektrophorese

schon bei Versuchsbedingungen von 400 V und 40 mA auf über 30 Grad Celsius. Es wurde dadurch brüchig und nahm ein bräunliche Farbe an, die eine Identifizierung des p-Nitrophenols unmöglich machte. Wurde durch die Kühlplatte die entstehende Wärme jedoch abgeführt und das Gel konstant bei + 5 Grad Celsius gehalten, konnte die Spannung auf 800 V und die Stromstärke auf 80 mA erhöht werden. Dadurch verringerte sich die bei niedrigeren Strom- und Spannungswerten notwendige Laufzeit.

2 Stunden bei 800 V und 80 mA waren für eine deutliche Auftrennung der Proteine ausreichend. Längere Laufzeiten gingen zu Lasten der Schärfe der einzelnen Banden.

3.1.3.4 Einfluß der verschiedenen Puffer

Die Hydrolyse von E 600 durch die Paraoxonase wurde sowohl beim Glycinpuffer pH = 11,2 wie beim Trispuffer pH = 9 wie auch in wässriger Lösung ausgelöst. Sie fiel jedoch in wässriger Lösung deutlich schwächer aus, was längere Reaktionszeit, stärkere Diffusion des p-Nitrophenols ins Gel und damit unschärfere Lokalisation bedeutet. Wie KRISCH (1968) bei der Bestimmung des pH-Optimums für die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch menschliches Serum zeigte, steigt die nichtenzymatische Hydrolyse von E 600 ab einem pH = 12 steil an. Da die Hydrolyse vom Puffer mit pH = 11,2 wie auch vom Puffer mit pH = 9 gleichermaßen

ausgelöst wurde, bei dem Puffer mit $\text{pH} = 9$ die nichtenzymatische Hydrolyse aber vernachlässigt werden kann, ist dem Tris-Puffer $\text{pH} = 9$ der Vorzug zu geben.

3.1.3.5 Einfluß der E 600 Konzentration

Bei den verschiedenen E 600 Konzentrationen war kein Unterschied im Ausmaß der Hydrolyse festzustellen, es genügt deshalb die kleinste Menge an E 600, nämlich $50 \mu\text{l}$ in 250 ml Puffer.

3.1.3.6 Einfluß von Calciumzusatz

Ein Unterschied im Ausmaß der Hydrolyse bei Zusatz von Calcium, die Lösung war $0,1 \text{ molar}$, war nicht festzustellen. Es genügt also scheinbar das "endogene" Calcium des Serums für die Reaktion.

3.1.3.7 Einfluß der Serummenge

Ein Vergleich der Serummenngen, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden, zeigte, daß zu viel Serum, etwa drei oder mehr getränkte Filterpapiere, nur eine Verzerrung der Banden bewirkt. Ein Filterpapier mit etwa $15 \mu\text{l}$ Serum ist durchaus ausreichend.

3.1.3.8 Hemmung durch EDTA

Die von KRISCH (1968) festgestellte Hemmbarkeit der Spaltung von E 600 durch EDTA konnte bestätigt werden. Nach Zusatz von 10^{-2} Mol EDTA pro Liter Färbelösung trat im Gel keine Gelbfärbung mehr auf, was eine weitgehende Hemmung der Paraoxonaseaktivität durch EDTA beweist.

3.2 Versuche zum Umfärben des gelben p-Nitrophenol

Wie oben bereits erläutert, zeigt sich die Hydrolyse des E 600 in einem gelben p-Nitrophenolfleck. Diese Art der Darstellung der Paraoxonaseaktivität hat jedoch zwei Nachteile. Erstens ist in farblosem Gel ein gelber Fleck schlecht zu sehen bzw. zu fotografieren, zweitens diffundiert das p-Nitrophenol sehr schnell ins Gel und macht dadurch eine genaue Lokalisation der Paraoxonaseaktivität unmöglich.

Es war deshalb das Ziel der folgenden Versuche, das gelbe p-Nitrophenol sofort nach Auftreten umzufärben und so deutlicher sichtbar bzw. durch Verhindern der Diffusion ins Gel örtlich gut bestimmbar zu machen. Als Umfärbereagenzien wurden Dansylchlorid, Fast Red TR und o-Kresol benützt.

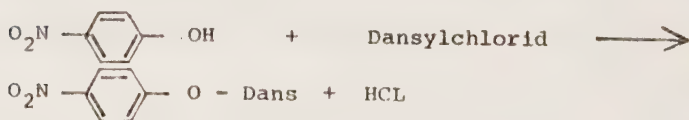
3.2.1 Versuche mit Dansylchlorid

PRIBYL und HERZEL beschrieben 1976 einen dünn-
schicht-
chromatographischen Nachweis von herbiciden Verbindungen
durch Dansylierung. Geeignet für ihr Verfahren sind alle
Verbindungen, die Aminogruppen oder Hydroxylgruppen aufwei-
sen oder zu solchen Verbindungen hydrolisierbar sind.

Es sollte nun getestet werden, ob eine Dansylierung auch
im Stärkegel möglich ist.

3.2.1.1 Material und Methode

Zwei Wege zur Dansylierung wurden versucht. Erstens wurde
versucht p-Nitrophenol direkt zu dansylieren:



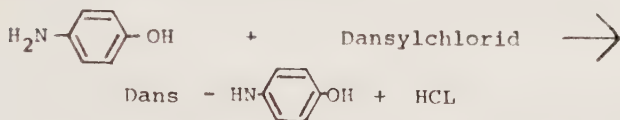
Das Gel wurde mit dem gelben p-Nitrophenolfleck in eine
Färbewanne mit folgender Lösung gelegt:

0,2 g Dansylchlorid (= 5-Dimethylamino-naphtalinsulfon-
säure-(1)-chlorid)

+ 100 ml Methyl-isobutyl-keton.

Es wurde 5 Minuten darin gebadet und dann auf einer Glas-
platte unter die UV-Lampe gelegt.

Zweitens wurde versucht p-Aminophenol zu dansylieren:



Dazu mußte das p-Nitrophenol erst zu p-Aminophenol reduziert werden. Reduktionsmittel war TiCl_3 in nachstehender Lösung:

10 ml 15 %ige TiCl_3 - Lösung +
90 ml aqua bidest.

Nach ca. 3 Minuten in diesem Bad waren die gelben p-Nitrophenolflecken verschwunden und p-Nitrophenol zu p-Aminophenol reduziert worden.

Das Gel wurde nun auf eine Glasplatte gelegt und mit einem Filterkartonstreifen bedeckt, der mit Dansylchloridlösung getränkt war. Anschließend wurde das Gel unter die UV-Lampe gelegt. Nach drei Minuten wurde der Filterkartonstreifen entfernt und das Gel auf hellgrüne Fluoreszenzstellen untersucht.

3.2.1.2 V Versuchsergebnisse

Bei Betrachtung unter der UV-Lampe bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$ fluoreszierte bei beiden Methoden jeweils das gesamte Gel. Eine Differenzierung

einzelner Bezirke war nicht möglich.

3.2.2 Versuch mit Fast Red TR

Das Diazoniumsalz Fast Red TR (= 4-Chlortoluol-1,5-diazonaphthyl-disulfonat) der Firma Sigma gehört zu den Farbstoffen, die durch Azokupplung, eine aromatische elektrophile Reaktion, stabile farbige Diazoverbindungen bilden. Bedingung für eine Reaktion mit Fast Red TR ist eine Temperatur von 0 bis + 4 Grad Celsius, die durch Zusatz von Eiswürfeln zur Reaktionslösung erfüllt wird.

3.2.2.1 Material und Methode

Verwendet wurde das bei 3.1.4.2 beschriebene Gel. Um eine Diffusion des p-Nitrophenols ins Gel zu vermeiden, mußte die Azokupplung möglichst kurz nach Auftreten der gelben p-Nitrophenolflecken versucht werden. Dies war meistens 5 bis 10 Minuten nach Einlegen der Gele in die E 600 Lösung der Fall.

Die Gele wurden nacheinander in vier verschiedene Bäder getaucht.

Bad 1: Hier erfolgte die Reduktion von p-Nitrophenol mit Natrium-dithionit zu p-Aminophenol.

Herstellung der Lösung:

1 Spatelspitze Natrium-dithionit + 100 ml Ammoniakpuffer pH = 9

Für diesen Ammoniakpuffer pH = 9 wurde 1 Mol NH_4Cl (= 53,5 g) in ca. 0,5 Liter aqua bidest. aufgelöst, dann mit konzentrierter NH_3 -Lösung auf pH = 9 gebracht und auf 1 Liter mit aqua bidest. aufgefüllt. Abschließend wurde der pH-Wert nachreguliert.

Das Gel wurde solange in der Lösung belassen, bis die gelben p-Nitrophenolflecke verschwunden waren. Das war meistens nach ca. 10 Minuten der Fall.

Bad 2: Hier wurde das überschüssige Reduktionsmittel oxidiert, Dauer etwa 5 Minuten.

Herstellung der Lösung:

20 ml H_2O_2 (Perhydrol) + 80 ml aqua bidest.

Bad 3: Es bestand aus ca. 100 ml aqua bidest, worin die Gele etwa 3 Minuten lang ausgewaschen wurden.

Bad 4: Hier wurde versucht, das p-Aminophenol mit Fast Red TR zu kuppeln.

Herstellung der Lösung:

0,1 g Fast Red TR + 100 ml aqua bidest., dazu Eiswürfel in ausreichender Menge, um eine Lösungstemperatur von 0 bis + 4 Grad Celsius zu gewährleisten.

Das Gel wurde in allen Bändern entweder manuell mit einem Spatel oder mit einem elektrischen Rührer gut bewegt.

Die Lösungen wurden nach zweimaligem Gebrauch verworfen.

3.2.2.2 Versuchsergebnisse

Nachdem das Gel alle Bäder durchlaufen hatte, zeigte sich folgende Reaktion. Bei Bad 1 verschwand der gelbe p-Nitrophenolfleck. Bei Bad 2 und 3 blieb das Gel unverändert farblos. Bei Bad 4 blieb das Gel ebenfalls farblos, nur das Lösungsbad selber nahm eine bräunliche Färbung an. Eine Azokupplung des Fast Red TR mit dem p-Aminophenol im Gel hatte folglich nicht stattgefunden.

3.2.3 Versuch mit o-Kresol

Mit p-Aminophenol reagiert o-Kresol durch oxydative Kopp-
lung zu einem sogenannten Indophenolfarbstoff.

3.2.3.1 Material und Methode

p-Nitrophenol sollte mit TiCl_3 -Lösung zu p-Aminophenol reduziert werden und letzteres dann mit o-Kresol die oben beschriebene Reaktion eingehen.

Herstellung der TiCl_3 -Lösung:

5 ml 15 %ige TiCl_3 -Lösung + 5 ml aqua bidest.

Herstellung der o-Kresol-Lösung:

80 ml 2 n NH_3 -Lösung + 10 ml o-Kresol

Das verwendete o-Kresol wurde nur aus dem Überstand einer gebrauchsfertigen gesättigten wässrigen o-Kresol-Lösung abpipettiert.

Das mit E 600 Lösung inkubierte Gel wurde in die o-Kresol-Lösung gelegt und diese mit einem elektrischen Rührer bewegt. Gleich danach wurden 10 ml TiCl_3 -Lösung dazugegeben und wieder gut durchmischt.

Um das überschüssige TiCl_3 zu neutralisieren, wurde die Lösung nach 10 Minuten mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (= Ammoniumperoxodisulfat) versetzt.

3.2.3.2 Versuchsergebnisse

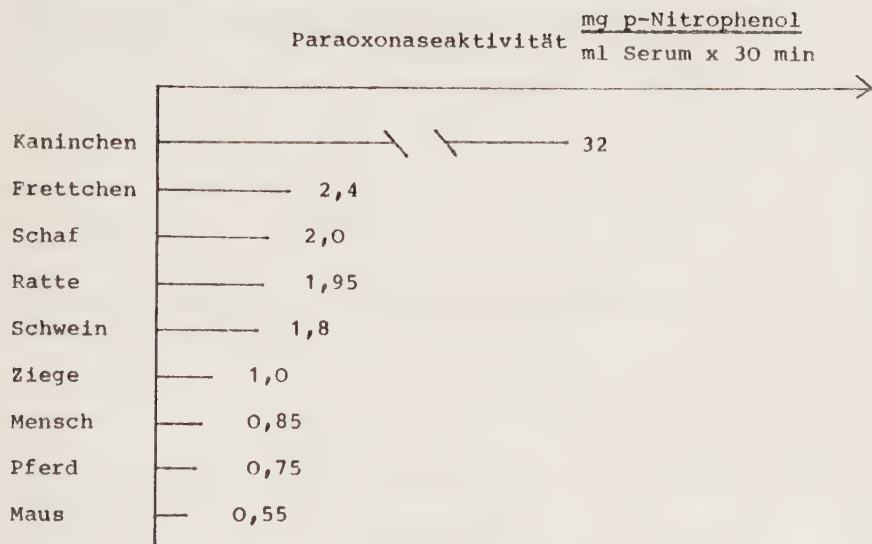
Sobald zu der wasserhellen o-Kresol-Lösung TiCl_3 -Lösung zugegossen wurde, färbte sich die Lösung tiefdunkelblau. Der gelbe p-Nitrophenolfleck im Gel verschwand nach ca. 3 Minuten. Die Kopplung von p-Aminophenol an o-Kresol trat jedoch offensichtlich nicht ein, da im Gel keine Indophenolfarbstellen sichtbar wurden.

Nach 10 Minuten Rühren der Lösung, ohne jegliche Veränderung beobachten zu können, wurde Ammoniumperoxodisulfat zugesetzt. Die Farbe der Lösung schlug von tiefdunkelblau nach grauweißlich um. Das Gel selbst blieb überall farblos.

3.3 Versuche zur Lokalisation der Paraoxonase im Serum von Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Esel und Huhn

ALDRIDGE untersuchte schon 1953 Serumesterasen bei verschiedenen Tierarten. Durch vergleichende Versuche fand er ein Paraoxon spaltendes Enzym, die Paraoxonase, die er seiner A-Esterase gleichsetzte. Innerhalb der einzelnen Tierarten waren die Enzymaktivitäten unterschiedlich, was ALDRIDGE auf Proteinunterschiede zurückführte. Seine Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung.

Abb. 3. Paraoxonaseaktivitäten verschiedener Tierarten
nach ALDRIDGE (1953)



Die Fragestellung war nun, ob bei verschiedenen Tierarten eine Paraoxonaseaktivität elektrophoretisch nachzuweisen war und wo sich die Paraoxonase im Vergleich zum Serumproteinmuster befindet.

3.3.1 Material und Methode

Die Tierseren wurden vom Schlachthof in Erlangen geholt. Sie waren nicht älter als zwei Tage. Die Methode zur elektrophoretischen Auftrennung der Seren war die gleiche wie in 3.1 beschrieben. Aufgetrennt wurden Seren von Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Esel und Huhn.

3.3.2 Färben des Stärkegels

Als Färbelösung wurde die E 600 Stammlösung verwendet, die auch bei den menschlichen Seren die besten Ergebnisse zeigte:

50 μ l E 600 +
2,5 μ l Triton +
250 ml Tris-HCl-CaCl₂-NaCl-Puffer

Zur Proteinfärbung wurde wieder Amidoschwarz benützt.

3.3.3 Hemmversuch mit EDTA

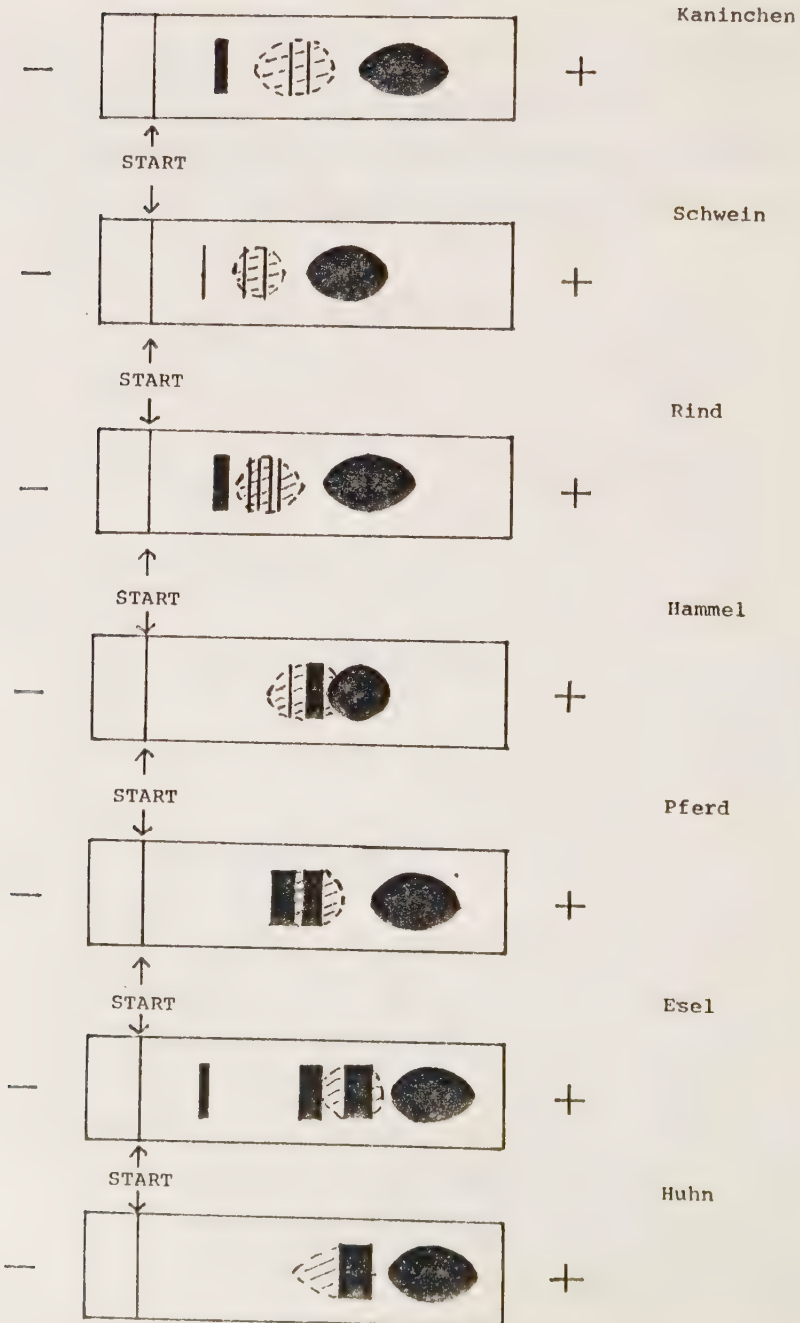
Wie beim Humanserum sollte auch bei den Tierseren geprüft werden, ob die Paraoxonaseaktivität durch EDTA gehemmt wird. Die EDTA-Konzentration betrug wiederum 10^{-2} Mol/l.

3.3.4 Versuchsergebnisse

Bei allen Tierseren war nach Inkubation mit der E 600 Lösung ein gelber p-Nitrophenolfleck im Gel zu sehen. Unterschiede ergaben sich jedoch in der Zeit bis zum Auftreten des gelben p-Nitrophenols und in der Farbhintensität. Mit Abstand am schnellsten, nach ca. 2 Minuten, war die Reaktion beim Kaninchenserum zu erkennen. Es folgten nach 10 bis 15 Minuten die Seren von Hammel, Pferd, Rind, Esel und Schwein. Die schwächste Farbreaktion zeigte das Serum des

Huhns nach etwa 60 Minuten. In Abbildung 4 ist der Ort der Paraoxonaseaktivität (gestrichelt) im Vergleich zum Proteinmuster bei den einzelnen Tierarten zur Verdeutlichung bildlich dargestellt.

Abb. 4. Vergleich der Orte der Paraoxonaseaktivität (gestrichelt) zum Proteinmuster bei verschiedenen Tierarten



Aus den Versuchen geht hervor, daß auch im Serum von Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Esel und Huhn Paraoxonase vorhanden ist. Die Aktivität jedoch muß wegen des zeitlich unterschiedlichen Auftretens von p-Nitrophenol verschieden hoch sein. Auch ist der Ort der Paraoxonaseaktivität und das Proteinmuster bei Kaninchen, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Esel und Huhn jeweils verschieden.

Der Hemmversuch mit EDTA zeigte, daß EDTA in einer Konzentration von 10^{-2} Mol/l die Paraoxonaseaktivität auch bei den Seren verschiedener Tierarten weitgehend hemmt. Bei keinem der Tierseren konnte nach Zusatz von EDTA in obiger Konzentration zur E 600 Lösung ein gelber p-Nitrophenolfleck im Gel festgestellt werden.

4. Diskussion und Zusammenfassung

Mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese wurden menschliche Seren und die Seren von 7 verschiedenen Tierarten aufgetrennt. Als günstigste Parameter für die Elektrophorese ergaben sich 800 Volt Spannung und 80 Milliampère Stromstärke bei 2 Stunden Laufzeit.

Zur Proteinfärbung wurde Amidoschwarz verwendet, zur Lokalisation der Paraoxonaseaktivität eine E 600 Lösung, bestehend aus 50 μ l E 600, 2,5 μ l Triton und 250 ml Tris-HCl-Puffer mit Zusatz von CaCl_2 und NaCl. Beim Puffer lag der pH-Wert bei 9, um die nichtenzymatische Hydrolyse auszuschalten.

Mit der Proteinfärbung konnten beim menschlichen Serum mindestens 5 Serumproteinbanden und ein Albuminfleck dargestellt werden, mit der Paraoxonasefärbung wurde der gelbe p-Nitrophenolfleck nach ca. 5 Minuten sichtbar. Ein Vergleich des Ortes der Paraoxonaseaktivität mit den Proteinbanden ergab eindeutig, daß sich der Ort der Paraoxonaseaktivität zwischen dem Albuminfleck und der α_1 -Globulinbande befindet. Eine millimetergenaue Zuordnung war nicht möglich, da während der ca. 5 Minuten dauernden Hydrolyse des E 600 durch das menschliche Serum das entstehende gelbe p-Nitrophenol sehr schnell ins Gel diffundierte.

Die Versuche, das gelbe p-Nitrophenol im Gel mit Dansylchlorid, FAST RED TR oder o-Kresol reagieren zu lassen, schlugen bei der gewählten Methode fehl. Der eindeutige Beweis einer lokalen Farbreaktion konnte bei keiner der verwendeten Azoverbindungen sicher reproduziert werden, beim Versuch mit Dansylchlorid fluoreszierte das gesamte Gel.

Bei den 7 Tierseren konnte der Ort der Paraoxonaseaktivität im Vergleich zum Proteilmuster eindeutig bestimmt werden. Auffällig war, daß das Kaninchenserum die höchste Paraoxonaseaktivität, gemessen nach KRISCH, besaß, und auch mit der E 600 Färbelösung am schnellsten reagierte. Der gelbe p-Nitrophenolfleck entstand bereits nach 2 Minuten. Bei den Seren von Schwein, Rind, Hammel, Pferd und Esel war nach 15 bis 20 Minuten das gelbe p-Nitrophenol zu erkennen. Am längsten dauerte die Farbreaktion beim Serum des Huhns, etwa 1 Stunde.

Bei Zusatz von EDTA in einer Konzentration von 10^{-2} Mol/l zur E 600 Färbelösung konnte die Paraoxonaseaktivität des menschlichen Serums wie auch aller 7 Tierseren vollständig gehemmt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Aldridge, W.N.: Serum esterases. 1. Two types of esterase (a and b) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
- Aldridge, W.N.: Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
- Biochem. J. 53, 117 (1953 b)
- Augustinsson, K.B. und Heimbürger, G.: The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
- Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)
- Baitsch, H. und Liebrich, K.G.: Die Haptoglobintypen. Methodik ihrer Bestimmung, Allelen-Häufigkeiten in einigen Stichproben.
- Blut 7, 27 (1961)
- Dumbach, J.: Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumpaeroxonase.
- Dissertation Erlangen 1976
- Erdös, E.G. and Boggs, I.E.: Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
- Nature, Lond. 190, 716 (1961)
- Fleischer, E. and Lundevall, J.: Inheritance of serum groups.
- Europ. Soc. Haematol., Congr. Proc. 2, 906 (1958)
- Friedberg, K.D. und Sakai, F.: Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM).
- Dtsch. Z. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

Galatius - Jensen, F.: Investigations of the genetic mechanism of the haptoglobins with a view to the medico-legal aspects.

Act. med. leg. soc. 9, 42 (1956)

Geldmacher -v. Mallinckrodt, M., Rabast, U., Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 (O,O - Diäthyl - O - (p-nitrophenyl) - phosphat).

Arch. Toxikol. (Berl.) 25, 223 (1969)

Geldmacher -v. Mallinckrodt, M., Baumgartner, W., Petenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H. und Metzner, H.: Korrelation

zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600 spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

Geldmacher -v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flügel, M., Fischer, Th. und Hiller, Th.: Genetisch

determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2)

Humangenetik 17, 331 (1973)

Geldmacher -v. Mallinckrodt, M., Petenyi, M., Flügel, M., Burgis, H., Dietzel, B., Metzner, H., Nirschl, H. und

Renner, O.: Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)

Geldmacher -v. Mallinckrodt, M., Hommel, G. und Dumbach, J.:

On the genetics of the human serum paraoxonase.

Hum. Genet. 50, 313 (1979)

Hommel, G.: Estimation of the distribution of a genetically determined enzyme polymorphism by a stochastical outside criterion.

Biometr. J. 20, 371 (1978)

Koller, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

In: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd II, K. Lang, E. Lenartz (eds), p. 931.

Berlin - Heidelberg - New York: Springer (1955)

Krisch, K.: Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat durch menschliches Serum.

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

Neal, R.A.: Studies on the metabolism of diethyl - 4 -

nitrophenyl - phosphoro - thionate (Parathion) in vitro.

Biochem. J. 103, 183 (1967)

Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F., Evans, D.A.P.:

Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.

J. Med. Genet. 13, 337 (1976)

Pribyl, J. und Herzel, F.: Dünnschicht - chromatographischer

Nachweis herbicider Verbindungen durch Dansylierung.

Z. Anal. Chem. 286, 95 (1977)

Smithies, O.: Zone elektrophoresis in starch gels: Group

variations in the serum proteins of normal human adults.

Biochem. J. 61, 629 (1955)

Smithies, O.: Grouped variations in the occurrence of
new protein components in normal human serum.

Nature, London, 175, 307 (1955)

Smithies, O. and Walker, N.F.: Notation for serum-protein
groups and the genes controlling their inheritance.

Nature, London, 178, 694 (1956)

Smithies, O.: Zone elektrophoresis in starch gels and its
application to studies of serum proteins.

Adv. in Prot. Chem. 14, 65 (1959)

Zech, R. und Zürcher, K.: Organophosphate splitting enzy-
mes in different animals.

Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427 (1974)

Für die Arbeitsmöglichkeit im Institut für Rechtsmedizin sowie für die freundliche Übernahme des Korreferates möchte ich mich hiermit bei Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling bedanken.

Mein Dank gilt besonders Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und ihre jederzeitige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Bei Herrn Dipl.-Chem. Peter Enders möchte ich mich herzlich bedanken für die vielen Tips und Ratschläge, die er mir bei der Durchführung meiner Versuche gab.

Lebenslauf

Personalien:

Peter Deinzer

geb. 18.11.1950 in Bad Berneck

Eltern: Peter Deinzer, Kaufmann

Dora Deinzer, geb. Genschow

Ausbildung:

1957 - 1961 Volksschule Neuenmarkt

1961 - 1970 Markgraf - Georg - Friedrich -
Gymnasium Kulmbach

1970 Abitur

1970 - 1972 Bundeswehr

1972 - 1974 Psychologiestudium in Erlangen

1973 - 1981 Medizinstudium in Erlangen

1981 Ärztliche Prüfung

